

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09119932 A**

(43) Date of publication of application: **06 . 05 . 97**

(51) Int. Cl

G01N 33/72
C12Q 1/00
G01N 21/78
G01N 33/52

(21) Application number: **08239666**

(22) Date of filing: **07 . 08 . 96**

(30) Priority: **07 . 08 . 95 JP 07231909**

(71) Applicant: **KDK CORP**

(72) Inventor: **MIZUTANI SATOSHI**
TAMURA HIROSHI
NISHINO SUSUMU

(54) **METHOD FOR AVOIDING EFFECT OF
HEMOGLOBIN**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To avoid the effect of absorption wavelength of hemoglobin by setting the measuring wavelength in a specific range when color reaction is measured through light absorption.

SOLUTION: When color reaction is measured through light absorption, the measuring wavelength is set in the range of about 517-529nm or about 580-592nm, preferably in the range of about 520-526nm or about 583-589nm. The change with time does not take place in the absorption of hemoglobin within such wavelength

range. The wavelength range may fluctuate slightly depending on the temperature at the time of measurement but it is negligible at least in the temperature range of 20-40°C. It is especially effective when rate assay is employed for measuring the reaction rate of a dry analytic element especially at two points or more and also effective sufficiently for liquid system. Both oxidative and reductive coloring agents may be used as a measuring system so long as it is a visible coloring agent. Since blank test is not conducted, operation is not doubled and both hemoglobin and target component are not degenerated.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-119932

(43) 公開日 平成9年(1997)5月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/72			G 0 1 N 33/72	A
C 1 2 Q 1/00		7823-4B	C 1 2 Q 1/00	Z
G 0 1 N 21/78			G 0 1 N 21/78	A
33/52			33/52	B

審査請求 未請求 請求項の数6 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平8-239666

(22) 出願日 平成8年(1996)8月7日

(31) 優先権主張番号 特願平7-231909

(32) 優先日 平7(1995)8月7日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 水谷 智

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 田村 浩

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 西野 進

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

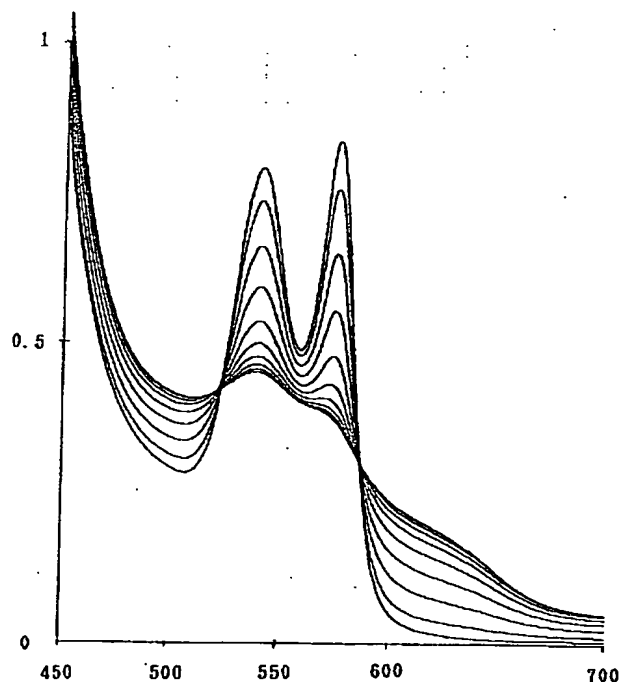
株式会社京都第一科学内

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビンの影響回避方法

(57) 【要約】

【課題】 例えば乾式分析要素で呈色変化を光吸収を用いて測定する際に、溶血ヘモグロビンの影響を、盲検を行わず、ヘモグロビンを変性させず、650nm以上で測定する方法よりも確実で、乾式分析要素の手軽さ・簡便性も損なわない方法で回避すること。

【解決手段】 測定波長を517nm～529nmか、又は、580nm～592nmに設定する。好ましくは、520nm～526nmか、又は、583nm～589nmに設定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】呈色反応を光吸収を用いて測定する際に、ヘモグロビンの吸収波長の経時変化を回避する方法であって、測定波長を517nm～529nmか、又は、580nm～592nmに設定することを特徴とする、ヘモグロビンの影響回避方法。

【請求項2】さらに好ましくは、測定波長を520nm～526nmか、又は、583nm～589nmに設定する、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項3】レートアッセイで測定する際に用いられる、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項4】可視系発色剤を用いる反応系で用いられる、特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。

【請求項5】乾式の分析要素で使用する、特許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。

【請求項6】酵素活性を測定する際に用いられる、特許請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、呈色反応をレートアッセイで光吸収測定を行う際の、ヘモグロビンの影響を回避する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床試験などで行われる生化学的分析・生化学的測定において、液系試薬を用いる方法と、乾式試薬（乾式分析要素と呼称される）を用いる方法がある。これら両者とも、検出や定量には光の反射率などを用いて、反応系の呈色を観察する。特に、乾式分析要素を用いた光吸収測定における一般的な分析方法の一つとして、レートアッセイ（二点以上の変化量を測定し、反応速度から濃度を求める方法）がある。

【0003】そこでは全血から血球を分離除去して血漿・血清を検体として用いるが、分離前から溶血している検体や、分離時に赤血球が溶血を起こした検体を使用する場合、血液中のヘモグロビンが血漿・血清中へ混入することがある。すると、目的成分のデータにヘモグロビンのデータが重なってしまう（所謂『かぶり』）。しかもヘモグロビンの吸収波長は経時的に変化するためにヘモグロビンのデータを単純に差し引くことも出来ず、得られるデータは実際のものとは大きく異なってしまう。

【0004】そのため、ヘモグロビンの吸収の経時変化を回避することが必要である。影響回避の方法として、検体盲検（ブランク）を測定する方法や、ヘモグロビンを物理的・化学的に変性させて経時変化を止める方法（特公平3-58467号）や、測光時にヘモグロビンの吸収波長の変化が少ない650nm以上の波長で測定する方法（特開昭62-209360号）等が考案されている。

【0005】これらの方法のうち、盲検を測定する方法

は二度手間で面倒であり、特に乾式分析要素においては使用する全ての試薬類が一体型になっているために盲検測定は困難である。また、ヘモグロビンを変性させる方法は操作が煩雑の上、分析の目的成分（例えば酵素など）をも変性させる危険性があり、手軽さ・簡便さが売り物の乾式分析要素には向かない。

【0006】測光時に、ヘモグロビンの吸収が少ない650nm以上の波長で測定する方法は、液系試薬を用いた場合では有効である。というのは、650nm以上にも僅かにヘモグロビンの吸収が存在するものの、液系の様に検体が大幅に希釈されていると、ヘモグロビンの吸収の少ない波長（例えば680nm）で測定すればヘモグロビンの被りは問題にならないからである。しかし一方、乾式分析要素の様に検体が希釈されずに分析に用いられると、ヘモグロビンの600nm以上の小さな吸収波長でもその吸収波長は測定値に重大な影響を与え、大きな問題となる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記の様な問題点を有さない、ヘモグロビンの吸収波長の経時変化に左右されない、新規な影響回避方法を得ることにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決すべく鋭意研究に取り組んだ結果、光吸収測定を行う際にヘモグロビンの吸収波長の経時変化を回避するためには、測定波長を517nm～529nmか、又は、580nm～592nmに設定すればよいことを発見した。さらに好ましくは、測定波長を520nm～526nmか、又は、583nm～589nmに設定する。

【0009】本発明は、乾式分析要素において特に有用であることは勿論のこと、液系でも十分に威力を発揮することは明らかである。また、混入したヘモグロビンの吸収波長の「経時変化」を回避することができるので、乾式分析要素で多用されている、『二点以上の変化量（反応速度）を測定する方法』すなわちレートアッセイを使用する系で特に有効である。測定系としては、可視系発色剤であれば酸化系発色剤でも還元系発色剤のいずれでも使用できる。

【0010】図1はヘモグロビンの吸収波長を示している（縦軸；吸光度（OD）、横軸；波長（nm））。図の様に、600nm以上の波長では吸収が少なく、ここで測定を行えば測定値に影響はないとされている。しかし先述の様に、この吸収は経時変化を起こすので、乾式では無視できない程の誤差になる。

【0011】その経時変化の様子を図2に示す。図2は、pH11の環境下でのヘモグロビンの吸収の変化を示したものである（縦軸；吸光度（OD）、横軸；波長（nm））。一本の線と隣の線との間は、1分間の間隔を示す。図から判断できる様に、時間が経過するにつれ

て曲線はなだらかに（水平に近く）なる。従って、時間経過に伴って着色度が増加してゆく反応試薬ならば、520nm～590nmの波長域では測定値へ負の誤差を与え、それ以外の可視部の波長では測定値へ正の誤差を与える。また逆に、時間経過に伴って着色が減退してゆく反応試薬ならば、520nm～590nmの波長域では測定値へ正の誤差を与え、それ以外の可視部の波長では測定値へ負の誤差を与える。より温和な条件下であっても、多かれ少なかれこのような変化が生じ、測定値へ正負の誤差を与えてしまい、特に乾式分析要素上ではその影響が顕著である。本発明の原理は、その経時変化の起こらない部分の波長で測定しようとするものである。 *

○試薬塗工液の調製

（処方）

L-アラニン	0.9 g
α-ケトグルタル酸	0.1 g
ピルビン酸オキシダーゼ	20 Kユニット
リン酸	0.05 g
ペルオキシダーゼ	10 Kユニット
4-アミノ-アンチピリン	0.05 g
N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン	0.05 g
アルギン酸ナトリウム	2.0 g
蒸留水	8.0 g
リン酸1カリウム	0.04 g
リン酸2ナトリウム	0.24 g

上記成分を混合して試薬塗工液を調製し、この塗工液を不透明ポリエチレンテレフタレートフィルム上へ濡れ厚さ200μmでコーティングし、40℃で30分間乾燥することにより、試薬層を得た。

【0014】○展開層の調製

（処方）

トリトンX-100	0.10 g
蒸留水	9.90 g

上記成分を混合したものを、厚さ0.25mmのポリエステル製の布（ザヴィーナミニマックス；（株）鐘紡の商標）に含浸して展開層を得た。

【0015】○分析要素への加工

先の試薬層の上に展開層を濡れた状態でラミネートし、40℃で30分間乾燥させた。得られた積層物を5mm×7mmにカットし、5mm×80mmの白色ポリエチレンテレフタレート片の先端に両面テープで固定し、分※

別の発色剤を使用したGPT測定用乾式分析要素

○試薬塗工液の調製

（処方）

L-アラニン	0.9 g
α-ケトグルタル酸	0.1 g
ピルビン酸オキシダーゼ	20 Kユニット
リン酸	0.05 g
ペルオキシダーゼ	10 Kユニット

*【0012】ヘモグロビンの吸収の経時変化が起こらない部分の波長は、520nm～526nmと583nm～589nmの範囲内にある。測定時の温度などの条件によってこの範囲は多少変動するが、臨床検査装置で一般的とされる調節温度である20度から45度まででは、上記変動は問題にならないほど小さい。

【0013】

【発明の実施の形態】以下に本発明の方法による例を示すが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

GPT（グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ）測定用乾式分析要素の例

※析要素とした。

【0016】○測定

健康人から採取した全血を、故意に溶血させたものとさせないものに分け、それぞれ血清分離した。各々の血清へGPTを最終濃度30ユニット/1になるように添加し、そこから6μlを分析要素へ適用し、37℃でインキュベーションし、インキュベート開始後3分から4分までの575, 585, 610nmの各反射率をモニターすることにより、ヘモグロビンの測定値への影響を調べた。ヘモグロビン濃度は、反射光度計（スポットケム；（株）京都第一科学の商標）で測定・確認し、溶血させたものは300mg/dlであった。反射率はクベルカームンク（Kubelka-Munk）の式に従ってK/S値に換算し、その差（ΔK/S値）を求めた。結果を表1に示す。

【0017】

5	6
4-アミノ-アンチピリン	0.05 g
N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン	0.05 g
アルギン酸ナトリウム	2.0 g
蒸留水	8.0 g
リン酸1カリウム	0.04 g
リン酸2ナトリウム	0.24 g

上記成分を混合して試薬塗工液を調製し、この塗工液を不透明ポリエチレンテレフタレートフィルム上へ濡れ厚さ200 μ mでコーティングし、40℃で30分間乾燥することにより、試薬層を得た。展開層の調製と、分析要素への加工及び測定方法は、先の実施例と同じに行った。結果を表2に示す。

【0018】○結果

表1と表2から判るように、測定波長を525nmか585nmに設定することで誤差を0%にすることができた。

【0019】

【発明の効果】以上の様に、本発明による手法を用いれ*

【表1】

測定波長	ヘモグロビン濃度		誤差
	0mg/dℓ	300mg/dℓ	
575nm	$\Delta 0.025$	$\Delta 0.021$	-14%
585nm	$\Delta 0.027$	$\Delta 0.027$	$\pm 0\%$
610nm	$\Delta 0.025$	$\Delta 0.026$	+4%

【表2】

測定波長	ヘモグロビン濃度		誤差
	0mg/dℓ	300mg/dℓ	
500nm	$\Delta 0.015$	$\Delta 0.018$	+20%
525nm	$\Delta 0.016$	$\Delta 0.016$	$\pm 0\%$
610nm	$\Delta 0.017$	$\Delta 0.014$	-17%

*ば、盲検を行わないので二度手間はなく、ヘモグロビンを変性させないので煩雑ではなく目的成分を変性させる危険性もない。そして、650nm以上で測定する方法よりも確実で、乾式分析要素の手軽さ・簡便性も損なわない。

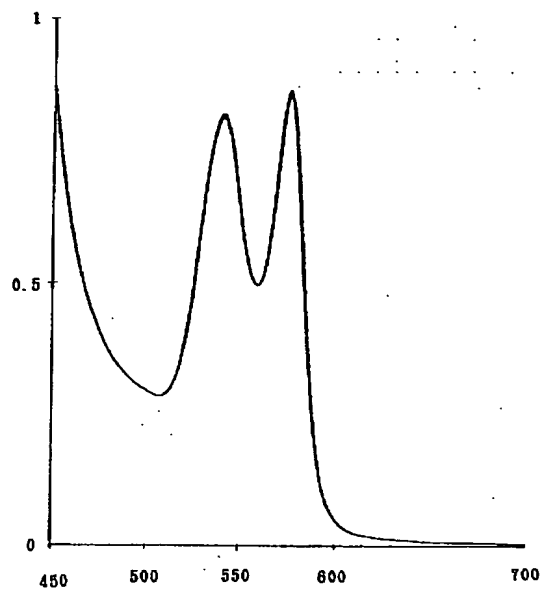
【0020】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヘモグロビンの吸収波長を示したものである。

【図2】図2は、ヘモグロビンの吸収波長の経時変化を示したものである。

【図1】



【図2】

